

REC'D 03 MAR 2003

10/500050

PCT/JP02/13782

25 JUN 2004

27.12.02

日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2001年12月28日

出願番号

Application Number:

特願2001-400280

[ST.10/C]:

[JP2001-400280]

出願人

Applicant(s):

武田薬品工業株式会社

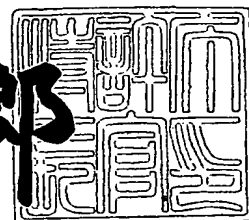
**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月12日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



REC'D 03 MAR 2003

出証番号 出証特2003-3006005

【書類名】 特許願

【整理番号】 P01-0283

【提出日】 平成13年12月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区春日台七丁目5-5

    【氏名】 小林 真

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ1  
003号

    【氏名】 荒井 俊光

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市松代3丁目12-1 武田松代レジデ  
ンス613号

    【氏名】 松村 歩佳

【特許出願人】

    【識別番号】 000002934

    【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100092783

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 小林 浩

    【電話番号】 03-3273-2600

【選任した代理人】

    【識別番号】 100095360

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 片山 英二

【選任した代理人】

【識別番号】 100093676

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 純子

【選任した代理人】

【識別番号】 100112726

【弁理士】

【氏名又は名称】 黒田 薫

【選任した代理人】

【識別番号】 100116850

【弁理士】

【氏名又は名称】 廣瀬 隆行

【選任した代理人】

【識別番号】 100114409

【弁理士】

【氏名又は名称】 古橋 伸茂

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 157061

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0115293

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸の定量方法及び核酸定量キット

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料中の特定の標的核酸を定量または検出する際に用いられる標準品であって、化学合成によって得られる合成ポリヌクレオチドからなることを特徴とする標準品。

【請求項 2】 前記合成ポリヌクレオチドが RNA、DNA 又はそれらの修飾物である請求項 1 記載の標準品。

【請求項 3】 前記合成ポリヌクレオチドが RNA または DNA である請求項 1 記載の標準品。

【請求項 4】 前記合成ポリヌクレオチドが RNA のときにセンス鎖、あるいは DNA のときにアンチセンス鎖である請求項 3 記載の標準品。

【請求項 5】 前記請求項 1～4 のいずれかに記載の標準品と少なくとも 1 対のプライマー対を含む核酸定量キット。

【請求項 6】 さらに蛍光プローブを含んでなる請求項 5 記載のキット。

【請求項 7】 さらに DNA ポリメラーゼを含んでなる請求項 6 記載のキット。

【請求項 8】 さらに逆転写酵素を含む請求項 7 記載のキット。

【請求項 9】 複数の標的核酸を定量するための核酸定量キットであって、複数の反応場所を有する反応器具の各反応場所に、標的核酸に対応するプライマー対を含む増幅試薬を充填し、その標的核酸に対応するプライマー対を充填していない反応場所に前記請求項 1～4 のいずれかに記載の標準品とその標準品に対応するプライマー対を含む増幅試薬を充填してなる核酸定量キット。

【請求項 10】 前記複数の標的核酸が特定疾患に関与する DNA または mRNA であり、その特定疾患を診断するために用いられる請求項 9 記載の核酸定量キット。

【請求項 11】 前記複数の標的核酸が遺伝子組換え食品に含有される組換え DNA であり、食品中の組換え DNA を検知するために用いられる請求項 9 記載の核酸定量キット。

【請求項 12】 試料中の特定の標的核酸を定量する方法であって、試料に標的

核酸に対応する少なくとも一对のプライマー対をそれぞれ含む増幅試薬を加え、標準品としての化学合成ポリヌクレオチドにその合成ポリヌクレオチドに対応するプライマー対を含む増幅試薬を加えて、それぞれ増幅反応を行い、増幅された標準品の量と増幅された標的核酸の量を測定し、これらの情報に基づいて増幅前の標的核酸の量を計算する核酸の定量方法。

【請求項13】 前記合成ポリヌクレオチドがRNA、DNA又はそれらの修飾物である請求項12記載の方法。

【請求項14】 前記合成ポリヌクレオチドがRNAである請求項12記載の方法。

【請求項15】 前記合成ポリヌクレオチドがセンス鎖である請求項14記載の方法。

【請求項16】 前記試料がヒトまたはその他の動物由来のmRNA試料である請求項12記載の方法。

【請求項17】 前記増幅試薬がさらに蛍光プローブを含んでなる請求項16記載の方法。

【請求項18】 前記増幅試薬がさらにDNAポリメラーゼを含んでなる請求項17記載の方法。

【請求項19】 前記増幅試薬が、さらに逆転写酵素を含む請求項18記載の方法。

【請求項20】 前記請求項9記載のキット又は前記請求項12の方法を用いてSNPの解析を行う方法。

【請求項21】 前記請求項10記載のキット又は前記請求項12の方法を用いて特定疾患を診断する方法。

【請求項22】 前記請求項11記載のキット又は前記請求項12の方法を用いて食品中に遺伝子組換えDNAが含まれているか否かを判定する方法。

【請求項23】 前記請求項10記載のキット又は前記請求項21記載の方法によって特定される、ある細胞や組織において特徴的に発現が亢進または減少している遺伝子DNAもしくはその遺伝子産物、又はその遺伝子産物に対するアゴニスト、アンタゴニストもしくは抗体を含んでなる医薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は、試料中の特定の標的核酸を定量するために用いられる検量線を作成するために用いられる標準品、それを用いた核酸の定量方法及び定量キットなどに関する。また、本発明は、その核酸の定量方法または定量キットを用いた特定疾患の診断方法、及びその特定された遺伝子DNAまたはその遺伝子産物を含む医薬品にも関する。

## 【0002】

PCR (polymerase chain reaction) 法は、微量の標的核酸を指数的に増幅した後に検出することができるので、遺伝子の発現解析、疾患の診断、遺伝子組換え食品の検査、自然食品における組換え遺伝子の混入の判定などの分野において幅広く用いられている。PCR法については、例えば、米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号及び同第4,965,188号などに詳しく記載されている。一般的なPCR法では、標的核酸を含み得る試料と、標的核酸に対応する一対のオリゴヌクレオチドプライマー、反応基質（デオキシヌクレオチド三リン酸）、DNAポリメラーゼなどを含む増幅試薬とを反応させ、標的核酸を指数的に増幅させることにより、微量に含まれる標的核酸の検出を容易にする。

また、PCR法において特定のmRNAを精度よく定量する方法として、蛍光プローブを用いるTaqMan法等が知られている。例えば、特許公開第2001-204483号公報には、hTERT mRNAを定量するTaqMan法が開示されている。

## 【0003】

一方、微量に含まれる標的核酸の定量の精度をあげるために、内部標準を用いた技術が開発されており、例えば、特開平11-123095号公報に開示されている。この公報には、内部標準となるDNA配列を含有するプラスミドを、増幅試薬中に存在させ、このプラスミドが産生するcRNAを内部標準として用いる標的核酸の定量方法が記載されている。

## 【0004】

## 【発明が解決しようとする課題】

上記方法によれば、内部標準を用いない方法と比較してより正確に標的核酸を定量することができる。しかしながら、この方法では、内部標準となるRNAがプラスミドから反応容器内で得られるので、試薬の保存状態、反応条件、その他の要因によっては、必ずしも一定量のRNAが産生されとは限らない。また従来の酵素あるいは生物により合成された標準品はその調製が煩雑でありしばしば困難である場合が存在する。従来の方法で標準品を調製するには、配列情報を基にして目的とする生物種の細胞、臓器、ウイルスなどからゲノムDNAもしくはRNAもしくはmRNAを抽出しそこから目的とする遺伝子の断片もしくはその情報を有するDNAもしくはRNAを酵素的もしくは生物的に合成する必要がある。また、材料となる生物種には入手困難なものや強い病原性を持つものなども含まれる。さらに、標準品の調製が生物から抽出された酵素類もしくは生物そのものを用いるため標準品に高精度の定量を阻害する生物学的コンタミネーションがおこることも考えられる。

したがって、上記のような不都合がなく、簡便な方法で得られ、生物学的コンタミネーションのない標準品、及びそれを用いて標的核酸を高精度に定量できる方法があれば、疾患遺伝子の特定、特定疾患の診断、その疾患の治療等の分野で有用である。

## 【0005】

## 【課題を解決するための手段】

すなわち本発明は、以下に示す、標準品、核酸の定量方法、核酸の定量キット、特定疾患の診断方法などを提供する。

(1) 試料中の特定の標的核酸を定量または検出する際に用いられる標準品であって、化学合成によって得られる合成ポリヌクレオチドからなることを特徴とする標準品、

(2) 上記合成ポリヌクレオチドがRNA、DNA又はそれらの修飾物である上記(1)記載の標準品、

(3) 上記合成ポリヌクレオチドがRNA又はDNAである上記(1)記載の標準品、

(4) 上記合成ポリヌクレオチドがRNAのときにセンス鎖、あるいはDNAのときにアンチセンス鎖である上記(3)記載の標準品、

(5) 上記(1)～(4)のいずれかに記載の内部標準品と少なくとも1対のプライマー対を含む核酸定量キット、

(6) さらに蛍光プローブを含んでなる上記(5)記載のキット、

(7) さらにDNAポリメラーゼを含んでなる上記(6)記載のキット、

(8) さらに逆転写酵素を含む上記(7)記載のキット、

(9) 複数の標的核酸を定量するための核酸定量キットであって、複数の反応場所を有する反応器具の各反応場所に、標的核酸に対応するプライマー対を含む増幅試薬を充填し、その標的核酸に対応するプライマー対を充填していない反応場所に前記請求項1～4のいずれかに記載の標準品とその標準品に対応するプライマー対を含む増幅試薬を充填してなる核酸定量キット、

(10) 上記複数の標的核酸が特定疾患に関与するDNAまたはmRNAであり、その特定疾患を診断するために用いられる上記(9)記載の核酸定量キット、

(11) 上記複数の標的核酸が遺伝子組換え食品に含有される組み換えDNAであり、食品中に遺伝子組換えDNAが含まれているか否か判定するために用いられる上記(9)記載の核酸定量キット、

(12) 試料中の特定の標的核酸を定量する方法であって、試料に標的核酸に対応する少なくとも一対のプライマー対をそれぞれ含む増幅試薬を加え、標準品としての化学合成ポリヌクレオチドにその合成ポリヌクレオチドに対応するプライマー対を含む増幅試薬を加えて、それぞれ増幅反応を行い、増幅された標準品の量と増幅された標的核酸の量を測定し、これらの情報に基づいて増幅前の標的核酸の量を計算する核酸の定量方法、

(13) 上記合成ポリヌクレオチドがRNA、DNA又はそれらの修飾物である上記(12)記載の方法、

(14) 上記合成ポリヌクレオチドがRNAである上記(12)記載の方法、

(15) 上記合成ポリヌクレオチドがセンス鎖である上記(14)記載の方法、

(16) 前記試料がヒトまたはその他の動物由来のmRNA試料である(12)記載の方法、



(17) 上記増幅試薬がさらに蛍光プローブを含んでなる上記(16)記載の方法、

(18) 上記増幅試薬がさらにDNAポリメラーゼを含んでなる上記(17)記載の方法、

(19) 上記増幅試薬が、さらに逆転写酵素を含む上記(18)記載の方法、

(20) 上記(9)記載のキット又は上記(12)の方法を用いてSNPの解析を行う方法、

(21) 上記(10)記載のキット又は上記(12)の方法を用いて特定疾患を診断する方法、

(22) 上記(11)記載のキット又は上記(12)の方法を用いて食品中に遺伝子組換えDNAが含まれているか否かを判定する方法。

、及び

(23) 上記(10)記載のキット又は上記(21)記載の方法によって特定される、ある細胞や組織において特徴的に発現が亢進または減少している遺伝子DNAもしくはその遺伝子産物、又はその遺伝子産物に対するアゴニスト、アンタゴニストもしくは抗体を含んでなる医薬。

#### 【0006】

以下、本発明について詳細に説明する。

(標準品)

まず、本発明は、試料中の特定の標的核酸を定量又は検出する際に用いられる標準品であって、化学合成によって得られる合成ポリヌクレオチドからなることを特徴とする。ここで、「標準品」とは、標的核酸を増幅し、得られた増幅生成物の量から、増幅前の標的核酸の量を計算する際に用いられる検量線を作成するため、あるいはSNPなどの特定の核酸配列を検出する際に用いられる標準品のことをいう。検量線の作成、増幅前の標的核酸の計算方法などについては後述する。

#### 【0007】

本発明で用いる標準品は、合成ポリヌクレオチドであり、好ましくは、化学合成によって得られた1本鎖もしくは2本鎖RNA、1本鎖もしくは2本鎖DNA

又はそれらの修飾物である。ここで、「修飾物」とは、一部が化学修飾されたものをいい、例えば、プリン環および／またはピリミジン環が化学修飾されたもの（例えば、メチル化されたプリンおよびピリミジン環、アシル化されたプリンおよびピリミジン環などを有するもの）、あるいはその他の複素環を含むもの、糖部分が化学修飾されたもの（例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されているもの）などが挙げられる。

化学合成によれば、単一の化学構造を有する目的ポリヌクレオチドを必要な量だけ確実に得ることができるので、本発明では化学合成ポリヌクレオチドが使用される。

本発明の標準品は、好ましくは、化学合成によって得られた1本鎖RNAであり、より好ましくは化学合成によって得られたセンス鎖である。また、化学合成による一本鎖DNAを用いる際は好ましくはアンチセンス鎖を用いるのがよい。2本鎖より、1本鎖のほうが、被定量物に近い状態のものを標準とすることができるので、定量の精度が向上するからである。

#### 【0008】

本発明の合成ポリヌクレオチドとしては、従来の生合成によって得られる標準品と同様の配列を有するものを用いることができる。このような標準品としては、18SリボソームRNA (18S Ribosomal RNA)、酸性リボソームタンパク質 (Acidic Ribosomal Protein)、ベータアクチン ( $\beta$ -actin)、サイクロフィリン (Cyclophilin)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、ホスフォグリセロキナーゼ (Phosphoglycerokinase)、ベータ2-ミクログロブリン ( $\beta$ 2-Microglobulin)、ベータグルクロニダーゼ ( $\beta$ -Glucuronidase)、ヒポキサンチンリボシルトランスフェラーゼ (Hypoxanthine Ribosyl Transferase)、転写因子IID (Transcription Factor IID) / TATA結合因子 (TATA Binding Factor)、トランスフェリンレセプター (Transferrin Receptor) 等が挙げられる。

当業者であれば、公知の配列に基づき、化学合成によって本発明の標準品であるポリヌクレオチドを合成することは容易である。公知のポリヌクレオチドの合

成方法として、例えば、ホスホアミダイド法、H-ホスフェート法等が知られている。

ホスホアミダイド法については、例えば、Wu, T., Ogilvie, K.K., and Pon, R.T. (1989). Prevention of chain cleavage in the chemical synthesis of 2'-O-silylated oligoribonucleotides. *Nucl. Acids Res.* 17, 3501-3517; Stawinski, J., Stromberg, R., Thelin, M., and Westman, E.. (1988); Studies on the t-butyl dimethyl-silyl group as 2'-O-protection in oligoribonucleotide synthesis via the H-phosphonate approach. *Nucl. Acids Res.* 16, 9285-9288; Scaringe, S.A.A., Franklyn, C., and Usman, N. (1990). Chemical synthesis of biologically active oligoribonucleotides using t-butyldimethyl-silyl protected ribonucleoside phosphoramidites. *Nucl. Acids Res.* 18, 5433-5441; Chaix, C., Molko, D. and Teoule, R. (1989). The use of labile base protecting groups in oligoribonucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 30, 71-74; Gasparutto, D., Livache, T., Bazin, H., Duplaa, A.M., Guy, A., Khorlin, A., Molko, D., Roget, A., and Teoule, R. (1992); Chemical synthesis of a biologically active natural tRNA with its minor bases. *Nucleic Acids Res.* 20, 5159-5166; Vinayak, R., Anderson, P., McCollum, C., and Hampel, A. (1992). Chemical synthesis of RNA using fast oligonucleotide deprotection chemistry. *Tetrahedron Lett.* 31, 7269-7272などの文献に記載されている。また、H-ホスフェート法については、例えば、Garegg, P.J., Regberg, T., Stawinski, J. and Stromberg, R. (1985). Formation of internucleotidic bonds via phosphonate intermediates. *Chem. Scripta* 25, 280-282; Garegg, P.J., Regberg, T., Stawinski, J. and Stromberg, R. (1986). Nucleoside hydrogenphosphonates in oligonucleotide synthesis. *Chem. Scripta* 26, 59-62; Garegg, P.J., Lidh, I., Regberg, T., Stawinski, J. and Stromberg, R. (1986); Nucleoside H-phosphonates. III. Chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides by the hydrogenphosphonate approach. *Tetrahedron Lett.* 27, 4051-4054; Froehler, B.C., Ng, P.G., and Matteucci, M.D. (1986). Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates. *Nucleic Acids Res.* 14, 5399-5407; Froehler, B.C., and

d Matteucci, M.D. (1986). Nucleoside H-phosphonates : Valuable intermediates in the synthesis of oligonucleotides. Tetrahedron Lett. 27, 469-472 などに記載されている。

なお、本発明で用いる合成ポリヌクレオチドは、増幅効率を考慮すると短いもののほうが好ましく、例えば、60～150mer、より好ましくは、60～100merのサイズを有する。

#### 【0009】

##### (核酸定量キット)

本発明において用いられる核酸定量キットは、上記標準品としての合成ポリヌクレオチドに加え、標的核酸に対応する少なくとも一对のプライマー対、標的核酸に対応するプローブ、DNAポリメラーゼ、緩衝液等を含む。これらのキットは、必要に応じて、例えば、プライマー伸長生成物の合成を触媒する薬剤、基質のヌクレオシド三リン酸塩、標識に使用する方法（例えば、標識がビオチンならば、アビジン-酵素抱合体及び酵素の基質及び色素原）、PCR又はハイブリダイゼーション反応に適した緩衝液などを含むことができる。

#### 【0010】

ここで、本発明において用いられる「標的核酸に対応するプライマー対」とは、標的遺伝子の配列（又は標的mRNAをコードする遺伝子配列）のエクソン領域の一方の鎖に相補的又は実質的に相補的である第1のプライマーおよび該標的遺伝子配列のエクソン領域の他方の鎖に相補的又は実質的に相補的である第2のプライマーから成るプライマーの一对をいう。

#### 【0011】

本発明においては、これらのプライマー対を少なくとも1対以上使って、標的核酸の増幅を行う。

#### 【0012】

標的核酸を増幅させるためのプライマー対または標準品を増幅させるためのプライマー対は、その標的核酸の配列に基づいて当業者であれば容易に設計することができる（例えば、Genome Res. 1996 Oct;6(10):986-94参照）。

#### 【0013】

例えば、標的核酸として、hMOR1 cDNAが選択される場合は、hMOR1 cDNA（配列番号1）の1129～1210位の相補配列のものを化学合成して標準品とすることができる。この場合は、上流プライマーとして5' -CCTTGGTTACAATCCCAGAACTAC-3' を、下流プライマーとして5' -AGGCAGCTGTTTGTGTAACCTAGA-3' を用いることができる。

## 【0014】

本発明において用いられる標的核酸に対応するプローブは、標的配列に応じて当業者に容易に設計できる（例えば、Genome Res. 1996 Oct;6(10):986-94参照）。本発明において用いられる適当なオリゴヌクレオチドプローブは、好ましくは約15～約50ヌクレオチドの長さを有し、より好ましくは約25～約35ヌクレオチドの長さを有する。オリゴヌクレオチドプローブは、生化学的、免疫化学的、又は化学的な手段によって検出可能な化学物質等を組込むことによって標識することができる。有用な標識としては、 $^{32}\text{P}$ 等の放射性同位元素、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート等の蛍光物質、ルミノール、ルシフェリン等の発光物質、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、パーオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素、ビオチン、および抗体等があげられる。

## 【0015】

本発明において用いられるDNAポリメラーゼとしては、逆転写活性および5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼ、例えば、Tth DNAポリメラーゼなどが挙げられる。

## 【0016】

本発明においては、公知のあるいは市販されている緩衝液が用いられる（例えば、PEBiosystems社製緩衝液；Genome Res. 1996 Oct;6(10):986-94参照）。

## 【0017】

なお、定量キットに含まれる各種試薬などの量は、試料の量、標的核酸の種類などに応じて適宜決定される。

## 【0018】

本発明のより好ましい態様によれば、複数の標的核酸を定量するための核酸定量キットであって、複数の反応場所を有する反応器具の各反応場所に、標的核酸

に対応するプライマー対をそれぞれ含む各増幅試薬を充填し、その標的核酸に対応するプライマー対を充填していない反応場所に前記請求項1～4のいずれかに記載の標準品とその標準品に対応するプライマー対を含む増幅試薬を充填してなる核酸定量キットが提供される。この定量キットを用いることにより、一度の操作で、試料中の複数の標的核酸の有無およびその量を検出することができる。

#### 【0019】

この態様では、複数の反応場所を有する反応器具が用いられ、標的核酸を含み得る試料および一連の既知濃度に設定された合成ヌクレオチドからなる標準品と各増幅試薬とのそれぞれの反応は、各反応場所で行われる。標準品の濃度はいずれでもよいが $10^1$ コピーから $10^7$ コピー程度が各容器に入っていることが好ましい。各増幅試薬は、標的核酸またはその合成ポリヌクレオチドを増幅することができるプライマー対をそれぞれ含む。ここで用いられる反応器具は、試料と各増幅試薬とを一度に反応させることができるように、2つ以上の反応場所を有している限り、反応器具の構成及び構造は限定されない。好ましくは、本発明において用いられる反応器具として、例えば、複数の穴を有するプレート、複数のスライドグラスを備えてなる反応器具、複数の試験管を備えてなる反応器具などが挙げられる。実験スペース、操作性等を考慮した場合は、複数の穴を有するプレートを好ましく用いることができる。これらのプレートは、使用する増幅試薬の数によって決められるが、市販されている96穴または384穴プレートが好ましく用いられる。しかし、増幅試薬の数に応じて所望の数の反応場所を設けた反応器具を使うことができる。

#### 【0020】

増幅試薬の数は、標的核酸の数に応じて調整されるので、特に限定されないが、例えば、10～800種類の増幅試薬および標的に応じた合成オリゴヌクレオチドからなる標準品を含んでなる定量キットが提供される。本発明の他の態様によれば、10～300種類の増幅試薬および標的に応じた合成オリゴヌクレオチドからなる標準品を含んでなる定量キットが提供される。増幅試薬の数が多い場合は、異なるセットの増幅試薬を複数枚のプレート（例えば、2～10枚のプレート）に分けてセットしておき、定量反応を複数回に分けて行うこともできる。

## 【0021】

## (核酸の定量方法)

次に、本発明の核酸定量方法について説明する。

本発明の核酸を定量する方法においては、試料に標的核酸に対応する一対のプライマー対とをそれぞれ含む増幅試薬を加え、標準品としての化学合成ポリヌクレオチドにその合成ポリヌクレオチドに対応する一対のプライマー対を含む増幅試薬を加えて、それぞれ増幅反応を行い、増幅された標準品の量と増幅された標的核酸の量を測定し、これらの情報に基づいて増幅前の標的核酸の量を計算する。

## 【0022】

## [試料及び標的核酸]

まず、本発明において対象となる試料は、標的となる核酸を含み得る試料であればよく、特に限定されない。本発明の対象となる試料は、例えば、ヒトまたはその他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）の組織あるいはその培養細胞株から採取したmRNA試料である。このような組織として、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳室、黒質）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などが挙げられる。このようなmRNA試料を用いて、その試料中に含まれる標的mRNAを定量することによって、mRNA試料を採取した部位における標的遺伝子の発現レベルを解析することができる。

## 【0023】

また、ある特定の疾患を罹患している患者由来のmRNA試料を用いれば、その疾患に関与している遺伝子（例えば、GPCR遺伝子）の特定が容易となる。特に、複数の遺伝子に関与しているといわれる癌などの多遺伝子関与疾患に関与するGタンパク質共役型レセプター、チロシンリン酸化酵素型レセプター、イオ

ンチャンネル遺伝子を特定する場合は、本発明によれば、各遺伝子の発現レベルを一度の定量操作で調べることができるので、関与遺伝子・タンパク質の特定が容易となる。

#### 【0024】

本発明においては、特定の遺伝子ファミリーに属する複数の遺伝子の発現解析をまとめて行うことにより、その遺伝子ファミリーの中で、ある細胞または組織においてその発現が特徴的に亢進または減少している遺伝子を同定することができる。ここで、「遺伝子の発現が特徴的に亢進または減少している」とは、正常細胞または組織における遺伝子の発現と比較して、生理学的有意さがみられる程度に大量にまたは少量に発現していることをいう。本発明において標的とする遺伝子ファミリーは、特に限定されないが、例えば、Gタンパク質共役型レセプター遺伝子ファミリー、チロシンリン酸化酵素型レセプター遺伝子ファミリー、イオンチャンネル遺伝子ファミリー、または転写因子、トランスポーター、プロテインキナーゼ、プロテインフォスファターゼ、プロテアーゼ、ヒートショックプロテイン、ATPaseもしくはDNA結合プロテインのいずれかに関連する遺伝子ファミリーなどから選択される。

#### 【0025】

また、本発明によれば、遺伝子組換え食品に含有されるDNAを標的核酸とすることによって、遺伝子組換え食品の検査、または遺伝子組換え技術を使用せずに得られた自然食品に、組換え遺伝子が混入しているか否かの判定を行うことができる。

なお、公知の遺伝子組換え食品としては、大豆、ジャガイモ、トウモロコシ、トマト、パパイアなどが知られている。そして、その組換え遺伝子、これを検出するためのプライマー対、一般的定量方法なども公知であり、例えば、「JAS分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 定量的PCR編」、平成13年4月、東京農林水産消費技術センター発行などに記載されている。

例えば、トウモロコシCB351検出用として、5'-CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA-3'と5'-GTA GCT GTC GGT GTA GTC CTC GT-3'からなるプライ



マー対が知られている。また、パパイヤ55-1 検出用として、5'-TTA CGG CGA GTT CTG TTA GG-3' と 5'-CAT GTG CCT GAG AAA TAG GC-3' からなるプライマー対が知られている。また、ジャガイモNew Leaf Y 検出用として、5'-AAA A GA GCT GTC CTG ACA GC-3' と 5'-TCC TCC TGC ATC AAT TGT GT-3' からなるプライマー対が知られている。

## 【0026】

本発明のほかの態様によれば、標的核酸は、Gタンパク質共役型レセプター、チロシンリン酸化酵素型レセプター、イオンチャネルなどをコードする遺伝子DNA又はそのmRNAである。この場合、標的Gタンパク質共役型レセプター、チロシンリン酸化酵素型レセプター、イオンチャネルなどのファミリーに属する遺伝子のmRNAに対応するプライマー対を含んでなる各増幅試薬とmRNA試料とを、反応器具の各反応場所において接触させることにより、増幅反応させ、mRNA増幅生成物を定量することによって、そのmRNA試料中に含まれていたGタンパク質共役型レセプター、チロシンリン酸化酵素型レセプター、イオンチャネルなどのファミリーに属する遺伝子の発現量を測定することができる。

## 【0027】

本発明の他の態様によれば、全ての公知のGタンパク質共役型レセプター、チロシンリン酸化酵素型レセプター、イオンチャネルなどのファミリーに属する遺伝子のmRNAに対応するプライマー対を全て準備し、そのプライマー対をそれぞれ含む増幅試薬を各反応場所にセットしておけば、一度の定量作業で、mRNA試料中において、どのGタンパク質共役型レセプター、チロシンリン酸化酵素型レセプター、イオンチャネルなどのファミリーに属する遺伝子のmRNAがどの程度産生していたかを知ることができる。勿論、必要に応じて、異なるセットの増幅試薬を複数枚のプレートに分けてセットしておき、定量反応を複数回に分けて行うこともできる。

## 【0028】

本発明の他の態様によれば、ある一群のGタンパク質共役型レセプター、チロシンリン酸化酵素型レセプター、またはイオンチャネルのファミリーに属する遺

伝子の mRNA に対応する一群のプライマー対を用いることにより、一度の定量操作で、その一群の G タンパク質共役型レセプター、チロシンリン酸化酵素型レセプター、またはイオンチャネルなどのファミリーに属する遺伝子のなかで高発現している G タンパク質共役型レセプター、チロシンリン酸化酵素型レセプター、またはイオンチャネルなどのファミリーに属する遺伝子を特定することができる。

なお、現在、G タンパク質共役型レセプター（または遺伝子）として次のものが公知である。

- (1) アセチルコリンレセプター:  $M_1; M_2; M_3; M_4; M_5$
- (2) アデノシンレセプター:  $A_1; A_{2A}; A_{2B}; A_3$
- (3) アドレノセプター (Adrenoceptors):  $\alpha 1A; \alpha 1B; \alpha 1D; \alpha 2A; \alpha 2B; \alpha 2C; \beta 1; \beta 2; \beta 3$
- (4) アンギオテンシンレセプター:  $AT1; AT2$
- (5) ボンベシン (Bombesin) レセプター:  $BB1; BB2; bb3$
- (6) ブラジキニンレセプター:  $B_1; B_2$
- (7) カルシトニン・アイニリン・CGRP 及びアドレノメヅリン (adrenomedullin) レセプター:
- (8) カンナビノイドレセプター:  $CB1; CB2$
- (9) ケモカインレセプター:  $CCR1; CCR2; CCR3; CCR4; CCR5; CCR6; CCR7; CCR8; CCR9; CCR10; CXCR1; CXCR2; CXCR3; CXCR4; CXCR5; CX_3CR1; XCR1;$
- (10) ケニオタクチックペプチド (Cheniotactic) レセプター:  $C3a; C5a; fMLP$
- (11) コレシストキニン及びガストリン (Cholecystokinin and gastrin) レセプター:  $CCK_1; CCK_2$
- (12) コーチコトロピン放出因子 (Corticotropin-releasing factor) レセプター:  $CRF_1; CRF_2$
- (13) ドーパミンレセプター:  $D1; D2; D3; D4; D5$
- (14) エンドセリンレセプター:  $ET_A; ET_B$
- (15) ガラニンレセプター (Galanin receptors):  $GAL1; GAL2; GAL3$

(16) グルタメートレセプター:  $mglu_1$ ;  $mglu_2$ ;  $mglu_3$ ;  $mglu_4$ ;  $mglu_5$ ;  $mglu_6$ ;  $mglu_7$ ;  $mglu_8$

(17) グリコプロテインホルモン (Glycoprotein hormone) レセプター: FS  
H; LSH; TSH

(18) ヒスタミンレセプター:  $H_1$ ;  $H_2$ ;  $H_3$ ;  $H_4$

(19) 5-HTレセプター:  $5-HT_{1A}$ ;  $5-HT_{1B}$ ;  $5-HT_{1D}$ ;  $5-HT_{1B}$ ;  $5-HT_{1F}$ ;  $5-HT_{2A}$ ;  $5-HT_{2F}$ ;  $5-HT_{2C}$ ;  $5-HT_3$ ;  $5-HT_4$ ;  $5-HT_{5A}$ ;  $5-HT_{5B}$ ;  $5-HT_6$ ;  $5-HT_7$

(20) ロイコトリエンレセプター: BLT;  $CysLT_1$ ;  $CysLT_2$

(21) リソフォスホリピッド (Lysophospholipid) レセプター:  $edg_1$ ;  $edg_2$ ;  $edg_3$ ;  $edg_4$

(22) メラノコーリン (Melanocortin) レセプター:  $MC_1$ ;  $MC_2$ ;  $MC_3$ ;  $MC_4$ ;  $MC_5$

(23) メラトニンレセプター:  $MT_1$ ;  $MT_2$ ;  $MT_3$

(24) ニューロペプチドYレセプター:  $Y_1$ ;  $Y_2$ ;  $Y_4$ ;  $Y_5$ ;  $Y_6$

(25) ニューロテンション (Neurotension) レセプター: NTS1; NTS2

(26) オピオイド: DOP; KOP; MOP; NOP

(27) P2Y レセプター:  $P2Y_1$ ;  $P2Y_2$ ;  $P2Y_4$ ;  $P2Y_6$ ;  $P2Y_{11}$ ;  $P2Y_{12}$

(28) パーオキシソームプロリフェレータ (Peroxisome proliferator) 活性化レセプター:  $PPAR-\alpha$ ;  $PPAR-\beta$ ;  $PPAR-\gamma$

(29) プロスタノイド (Prostanoid) レセプター: DP; FP; IP; TP;  $EP_1$ ;  $EP_2$ ;  $EP_3$ ;  $EP_4$

(30) プロテアーゼ活性化 (Protease-activated) レセプター: PAR1; PAR2; PAR3; PAR4

(31) ソマトスタチン (Somatostatin) レセプター:  $sst_1$ ;  $sst_2$ ;  $sst_3$ ;  $sst_4$ ;  $sst_5$

(32) タチキニン (Tachykinin) レセプター:  $NK_1$ ;  $NK_2$ ;  $NK_3$

(33) チロトロピン放出ホルモン (Thyrotropin-releasing hormone) レセプター:  $TRH_1$ ;  $TRH_2$

(34) ウロテンシン-II (Urotensin-II) レセプター:

(35) バソアクティブインテスティナルペプチド (Vasoactive intestinal peptide) 及びピチユイタリアデニレートサイクラーゼ活性ペプチド (pituitary adenylate cyclase activating peptide) レセプター:  $VPAC_1$ ;  $VPAC_2$ ;  $PAC_1$

(36) バソプレシン (Vasopressin) 及び オキシトシン (oxytocin) レセプター:  $V_{1a}$ ;  $V_{1b}$ ;  $V_2$ ; OT

また、現在、チロシンリン酸化酵素型レセプター、イオンチャネル遺伝子などのファミリーに属する遺伝子として、次のものが公知である。

(37) イオンチャネル:  $Na^+$ チャネル (タイプI; タイプII/タイプIIA; タイプIII; SCL11/NaG; PN1; NaCh6; NaDRG; SkM1/ $\mu 1$ , SkM2)、 $K^+$ チャネル (Kv; EAG; KQT; IRK; ROMK; GIRK;  $K_{ATP}$ 等)、 $Ca^{2+}$ チャネル ( $\alpha 1G$ ;  $\alpha 1E$ ;  $\alpha 1S$ ;  $\alpha 1C$ ;  $\alpha 1D$ ;  $\alpha 1B$ ;  $\alpha 1A$ ; IP3; リアノジンレセプターなど)、 $Cl^-$ チャネル ( $GABA_A$ ;  $GABA_C$ ; グリシンレセプター;  $ClC0$ ;  $ClC1$ ; CFTRなど)、非選択性カチオンチャネル (nAChR; 5-HT<sub>3</sub>; NMDA; AMPA;  $P_2X$ ATP; CNGなど) など

(38) チロシンリン酸化酵素レセプター: インスリンレセプター; EGFレセプターなど

#### 【0029】

本発明において用いられる核酸の定量方法は、ヒトGPCRの機能解析、SNP解析、遺伝子組換え食品の判定以外にも種々の用途に用いることができる。例えば、判明している疾患遺伝子が産生するmRNAを検出するプライマー対を含んでなる複数の増幅試薬のセットを用いることにより、特定疾患の診断をすることができる。本発明によれば、各遺伝子の発現レベルを正確に測定することができるので、公知の方法と比較して、より正確な診断ができるという利点がある。

#### 【0030】

##### [核酸の増幅]

本発明の定量方法において、試料中に含まれ得る標的核酸は、その標的核酸を増幅させるためのプライマー対を含む増幅試薬を用いて増幅される。本発明の好ましい態様によれば、標的核酸の増幅は公知のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて行われる (米国特許第4, 683, 195号; 第4, 683, 202号; 第4, 965, 188号など参照)。

mRNAを標的とする場合、その標的mRNAの増幅は、最初に、例えばウィルスの逆転写酵素を用いて、標的mRNAを逆転写し、生じたcDNAを増幅することによって行うことができる。さらに好ましい態様において、mRNAの増幅は、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を用いて行われる(米国特許第5,310,652号;第5,322,770号;第5,561,058号;第5,641,864号;5,693,517号等参照)。

### 【0031】

なお、本発明においては、前記ポリメラーゼ連鎖反応以外にも種々のmRNA増幅法が用いられる。そのような増幅法として、例えば、鎖置換アッセイ法(米国特許第5,455,166号など参照)、転写に基づく増幅法(TAS)(米国特許第5,437,990号;第5,409,818号;第5,399,491号等参照)、自立配列複製法(3SR)(WO92/08800等参照)などが挙げられる。

これらの増幅反応の反応条件は、使用する試薬の種類等に応じて、当業者によって容易に設定することができる。

### 【0032】

#### [標的核酸の定量]

次に、本発明の定量方法においては、核酸増幅生成物の生成量を定量する。増幅生成物の定量は、好ましくはプローブを使用する方法によって行われる。好ましい態様によれば、蛍光物質により標識したプローブを用いた方法によって行われる。

### 【0033】

本発明のより好ましい態様によれば、標的mRNAの定量は"Ta qMan法"又は"5'ヌクレアーゼアッセイ法"を用いて行われる(プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユエスエー、第88巻、第7276-7280頁(1991年);米国特許第5,210,015号;第5,487,972号;第5,804,375号など参照)。しかし、必要に応じて、SYBER Green法、ハイブリダイゼーション法などを用いることもできる。Ta qManアッセイ法において、5'末端を標識したプローブが用いら

れる。また、このプローブは、プローブがDNA合成のためのプライマーとして働くことを防ぐために3'末端が修飾される。この修飾として、リン酸基、蛍光物質等の末端への付加があげられる。標的mRNAの増幅は、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼ、例えばTth DNAポリメラーゼを用いて行われる。前記プライマーの下流の標的mRNAにハイブリダイズするプローブは、増幅反応の間、DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性によって分解される。新規に標的領域が増幅されるたびに、プローブが分解され、標識物質が遊離される。この遊離される標識物質を定量することにより、標的mRNA量が間接的に測定される。

#### 【0034】

遊離される標識物質を定量的に検出するためには公知の方法が用いられる。好ましい方法において、前記プローブは、2つの蛍光物質で5'および3'末端が標識され、このうちの一方が、他方の物質の蛍光を消光することができる。このプローブは鋳型DNAにハイブリダイズしている間は2つの蛍光物質の相互作用により蛍光が消光されているが、DNAポリメラーゼが有する5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により分解されることにより蛍光を発するようになる。増幅反応の進行に伴い蛍光が増大し、この蛍光の増大がモニターされる。

#### 【0035】

##### [検量線の作成及び増幅前の標的核酸量の計算]

本発明では、予め知られている量の標準品である合成ポリヌクレオチドを提供するので、これを増幅させて作成した「検量線」に基づいて標的核酸を含む試料の定量を行う。

#### 【0036】

検量線の作成については、例えば、特開平11-123095号公報に記載されている。すなわち、検量線は、ポリメラーゼ連鎖反応において作られる標準品としてのポリオリゴヌクレオチドの量を、増幅前に存在する種々の既知量のRNAに対してプロットすることによって作成される。高い精度を確保するために、増幅反応混合物の希釈度を段階的に変えた希釈系列を用いて増幅反応を行って検量線を作成する。この検量線は所定の増幅サイクル数に対して増幅される内部標

準品及び標的核酸の量をプロットすることによって作成される。

増幅前の標的核酸の量は、増幅される標的核酸の量を上記検量線と比較することによって求められる。つまり、標準品と標的核酸の一連の希釈系列を別の反応場所において同様の条件で増幅せしめ、そしてこの反応を増幅の指数期において停止させ、増幅前にこの試料中に存在している標的核酸の量を、標準品を用いて作成される検量線に対して外挿せしめることによって決定する。

#### 【0037】

(疾患の診断方法およびその疾患を治療する医薬)

次に、本発明の上記(23)による方法によれば、患者から採取したmRNA試料を用いて遺伝子発現解析を行い、特定疾患関連遺伝子の特徴的発現を検知することによってその患者が罹患している疾患を診断することができる。本発明によれば、特定疾患関連遺伝子ファミリー(特に、特定疾患関連GPCR遺伝子ファミリー)に属する遺伝子の発現をまとめて解析することにより、複数の特定疾患関連遺伝子のなかで、どの遺伝子の発現が特徴的であるかを一度の操作で特定することができる。

したがって、このようにして特定された遺伝子の遺伝子産物に対するアゴニスト、アンタゴニストもしくは抗体、またはその遺伝子産物をコードするDNAを含む医薬は、その診断対象の患者に対して特に有効である。本発明においては、複数の異常発現遺伝子を特定することができ、かつその遺伝子の発現レベルまでも正確に定量することができる。したがって、その患者に適当な処方として、複数のアゴニスト、アンタゴニストまたは抗体を選択し、その処方量についても、疾患関連遺伝子の発現レベルに応じて調製することができる。すなわち、本発明によれば、その患者のみに処方される、いわゆるテーラーメイド医薬の調製が可能となる。

#### 【0038】

より詳細に述べると、例えば、生体内においてあるレセプタータンパク質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない(該レセプタータンパク質の欠乏症)患者がいる場合に、①そのレセプタータンパク質を該患者に投与し該レセプタータンパク質の量を補充したり、②(イ)本発明のレセプタータンパク

質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）対象となる細胞に本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるレセプタータンパク質の量を増加させ、リガンドの作用を十分に発揮させることができる。

#### 【0039】

本発明の医薬は、特定された遺伝子が関与する疾患の予防または治療に有効であり、例えば、中枢疾患（例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内分泌疾患（例えば、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例えば、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）、癌（例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等）などの予防または治療に有用である。

本発明で特定された遺伝子の遺伝子産物（例えば、レセプタータンパク質）、それに対するアゴニスト、アンタゴニストもしくはその抗体、またはその遺伝子をコードするDNAを上記予防または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

#### 【0040】

一方、DNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、そのDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。そのDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

#### 【0041】

例えば、①本発明で用いられる医薬は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明の医薬を、生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤など



とともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

#### 【0042】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80<sup>TM</sup>、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

#### 【0043】

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトやその他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、

イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

#### 【0044】

本発明の医薬の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者(60kgとして)においては、一日につき約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者(60kgとして)においては、一日につき約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

#### 【0045】

(略号の表示)

本明細書において、塩基、アミノ酸、化合物等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づき表示を行い、その例を以下に記載する。またアミノ酸が光学異性体を取りうる場合、特に明示しなければL体を表す。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
a または A	: アデニン

t または T	: チミン
g または G	: グアニン
c または C	: シトシン
u または U	: ウラシル
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン

Asn : アスパラギン  
 Gln : グルタミン  
 pGlu : ピログルタミン酸

## 【0046】

本明細書の配列表記載の配列は以下のとおりである。

〔配列番号：1〕 hMOR1 の塩基配列を表す。

〔配列番号：2〕 実施例1 で用いた上流プライマーN-917F の塩基配列を表す。

〔配列番号：3〕 実施例1 で用いた下流プライマーN-998R の塩基配列を表す。

〔配列番号：4〕 実施例1 で用いたプローブN-945T の塩基配列を表す。

## 【0047】

## 【実施例】

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これは本発明の範囲を限定するものではない。

## 実施例1

(1) hMOR1 部分配列の化学合成DNAによる検量線の作成

この例は、TaqMan法における、hMOR1 cDNA（配列番号1：GenBankアクセッション番号 L25119）部分配列の化学合成DNAを用いた検量線の作成を記載する。

## 【0048】

(2) 試料

増幅は、hMOR1 cDNA部分配列の化学合成DNA（hMOR1T/M）の連続希釈溶液を用いて行った。本件のhMOR1COMの配列は、hMOR1 cDNA（配列番号1）内1129-1210位の相補配列に相当し、 $\beta$ -シアノエチルホスホアミダイド固相合成法（化学合成法）にて合成後、アンモニアクレーページ処理を行い、ポリアクリルアミド変性ゲル電気泳動による精製を行った。

## 【0049】

### (3) 増幅プライマー及び検出プローブ

hMOR1 cDNA部分配列の領域の増幅は、5' -CCTTGGTTACAATCCCAGAAACT AG-3' (配列番号: 2) の配列を有する上流プライマーN-917Fを、5' -AG GCAGCTGTTTGTGTAACTAGA-3' (配列番号: 3) の配列を有する下流プライマーN-998Rとを一对のプライマー対として用いて行った。

前記の上流プライマー、N-917Fは、hMOR1 cDNA (配列番号: 1) 内の1129-1153位の相補配列にハイブリダイズする。前記の下流プライマー、N-998Rは、hMOR1 cDNA (配列番号1) 内の1187-1210位の配列にハイブリダイズする。これらのプライマーは一緒に、完全長のhMOR1 cDNA配列の一部を含む、82塩基対の生成物の増幅を触媒する。

#### 【0050】

検出は、5' -CCAGACTGTTTCTTGGCACTTCTGCATTG-3' (配列番号: 4) を有するN-945Tをプローブとして用いて行った。このプローブは、hMOR1 cDNA (配列番号1) 内の1157-1185位の相補配列にハイブリダイズする。

前記のTaqMan形式での検出を可能にするために、前記プローブは、5' 端にフルオレセイン型の蛍光色素 (FAM: リポーター) 3' 端にローダミン型の蛍光色素 (TAMRA: クエンチャー) を標識した。

標識したプローブは、ハイブリダイズしない状態の場合には、蛍光共鳴エネルギーの移動現象により、リポーターの蛍光は抑制される。DNAポリメラーゼによる前記プローブの伸長を、増幅の間防ぐために、前記プローブの3' 末端はリン酸ブロックで合成した。

#### 【0051】

### (4) 増幅

各々のPCR増幅は、TaqMan (商標) Universal PCR Master MIX (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) を用いて、20  $\mu$  l の合計反応液量で行った。最終試薬濃度を以下の様にした: 試料遺伝子、1 $\times$  TaqMan (商標) Universal PCR Master

MIX (Ampli Taq Gold (商標) DNA Polymerase, AmpErase (商標) Uracil-N-glycosylase (UNG)、ROXなどを含む。)、900nM 各プライマー、200nM プローブ。

#### 【0052】

増幅反応は、ABI PRIZM (商標) 7900HT 配列検出システム (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) で行い、使用した温度周期のプロファイルを以下に示す。

サーマルサイクリングの時間及び温度 AmpErase UNG 反応のインキュベーション: 50℃で2分間、Ampli Taq Gold DNA Polymerase の活性化: 95℃で10分間、変性・アニール/伸長: 40 サイクル: 95℃で15秒間、60℃で1分間。

#### 【0053】

##### (5) 定量的 TaqMan 解析

TaqMan 反応において、増幅の間に、前記DNAポリメラーゼの5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性により、前記標的配列にハイブリダイズするプローブは5' 末端から加水分解される。その結果、リポーター蛍光色素は遊離し、蛍光強度が増加する。

増幅生成物の蓄積は、反応液の、リポーター蛍光色素の蛍光強度の増加を測定することによって、測定した。また、同時に、反応液の、実験誤差補正用の蛍光リファレンス (蛍光色素: ROX) の蛍光強度も測定した。各々の増幅サイクルの間、前記リポーター蛍光色素、及びリファレンス蛍光色素は、その最大の励起に近い波長の光で励起し、そして前記リポーター蛍光色素、及びリファレンス蛍光色の発光は、その発光の最大付近で測定される。これらの周波数は、ABI PRIZM (商標) 7900HT 配列検出システムであらかじめ決定され、別の検出機器を使用したならば、適当な周波数を選択すべきである。

#### 【0054】

蛍光測定値は、7900HT SDSソフトウェア (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) により解析した。まず、リポーター蛍光色素の蛍光強度をリファレンス蛍光色素の蛍光強度で標準化し、標準化リポーターシグナル (R

n) を算出した。更に、 $R_n$  から、PCR 初期サイクルのサイクルの間で比較的一定な  $R_n$  の平均値 (ベースライン) を差し引いた値を  $\Delta R_n$  とした。サイクル数に対して  $\Delta R_n$  をプロットした増幅曲線上で、増幅産物の指数関数的増幅に相当する蛍光シグナル ( $\Delta R_n$ ) の増加を解析アルゴリズムが初めて検出したサイクル数を  $Threshold\ Cycle (C_T)$  とした。具体的には、この  $C_T$  を決定するために、増幅産物の指数関数的増幅に至っていないと考えられる PCR 初期サイクル (3-15 サイクル) をベースラインとして、このサイクル内の平均  $\Delta R_n$  の標準偏差を計算した。次にこの標準偏差を 10 倍した値を  $Threshold$  と定義し、各増幅曲線上でこの  $Threshold$  の値に相当するサイクル数を  $C_T$  とした。

前記の増幅産物の指数関数的増幅期の間、 $C_T$  は、最初の標的コピー数の対数に比例する。後期のサイクルにおける増幅生成物の蓄積は、反応を阻害し、そしてついには反応のプラトーをもたらす。

#### 【0055】

#### (6) 結果

各試料で得た  $C_T$  値を、以下に示す。各  $C_T$  値は、4 回の反応から得た平均値を表わす。

試料	$C_T$ 値
$10^7$ コピーの hMOR1T/M	16.3
$10^6$ コピーの hMOR1T/M	19.2
$10^5$ コピーの hMOR1T/M	22.5
$10^4$ コピーの hMOR1T/M	26.0
$10^3$ コピーの hMOR1T/M	29.2
$10^2$ コピーの hMOR1T/M	32.9
0 コピーの hMOR1T/M	40.0 以上

#### 【0056】

検量線は、既知量の hMOR1COM の鋳型 (標準サンプル) の増幅から得た、 $C_T$  値から導いた。具体的には標準サンプルの初期既知量 (対数值) に対して

$C_T$ をプロットし、検量線を作成した。近似曲線には $C_T = (\text{Log} [\text{DNA}]_T - \text{Log} [\text{DNA}]_0) / \text{Log} (1 + e)$  (ここで、 $[\text{DNA}]_0$ は標的テンプレート  
の初期濃度であり、 $[\text{DNA}]_T$ は、 $C_T$ サイクル時の増幅産物の濃度であり、 $e$ は、平均増幅効率であり、そして $\text{Log} (X)$ は、 $X$ が10の底を表す対数である)の一次方程式を用い、7900HT SDSソフトウェアにより、パラメーターを定めた。

前記の試料から得た $C_T$ 値から、以下の検量線を得た：

$$C_T = 39.34 - 3.331 \times \text{Log} [\text{DNA}]_0$$

相関係数  $R^2 = 0.999$

平均増幅効率  $e = 99.6\%$

【0057】

#### 【発明の効果】

本発明の標準品は、化学合成によって得られる合成ポリヌクレオチドであり、従来の生合成によって得られるポリヌクレオチドからなる標準品と比較して、簡便な方法で目的とする配列のものを正確に得ることができるという利点がある。また、本発明の標準品は、生物学的コンタミネーションがないので、環境に対して安全であり、また高精度の定量を阻害する要因を少なくできるという利点がある。

また、本発明の定量方法及び定量キットによれば、標準品として1本鎖のポリヌクレオチドを用いた場合は、被定量物に近い状態のものを標準とすることができるので、より高精度の定量が可能となる。

【0058】

また、本発明の他の態様に係る定量方法及び定量キットによれば、多種類の標的核酸を含み得る試料について、多種類の標的核酸の有無及びその量を一度の処理で高感度で検出することができる。したがって、本発明によれば、標的遺伝子の発現解析を高感度で迅速に行うことができるシステムを提供することができる。

さらに、本発明の定量方法および定量キットを用いることによって、特定疾患の診断、遺伝子組換え食品の検査または自然食品中の遺伝子組換えDNAの混入



の判定などを高精度で行うことができる。

【0059】

【配列表】

[Sequence Listing]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Quantification Method and Quantification Kit of Nucleic Acids

<130> P01-0283

<160> 4

<210> 1

<211> 2162

<212> DNA

<213> Human

<400> 1

```

ggaattccgg ctataggcag aggagaatgt cagatgctca gctcgggtccc ctccgcctga      60
cgctcctctc tgtctcagcc aggactggtt tctgtaagaa acagcaggag ctgtggcagc      120
ggcgaaagga agcggctgag gcgcttgaa cccgaaaagt ctcggtgctc ctggctacct      180
cgcacagcgg tgcccggccg gccgtcagta ccatggacag cagcgtgcc cccacgaacg      240
ccagcaattg cactgatgcc ttggcgtact caagttgctc cccagcacc agccccggtt      300
cctgggtcaa cttgtccac ttagatggca acctgtccga cccatgcggt ccgaaccgca      360
ccaacctggg cgggagagac agcctgtgcc ctccgaccgg cagtcacctcc atgatcacgg      420
ccatcacgat catggccctc tactccatcg tgtgcgtggt ggggctcttc ggaaacttcc      480
tggtcatgta tgtgattgtc agatacacca agatgaagac tgccaccaac atctacattt      540
tcaaccttgc tctggcagat gccttagcca ccagtaccct gcccttcag agtgtgaatt      600

```

acctaattggg aacatggcca tttggaacca tcctttgcaa gatagtgatc tccatagatt 660  
 actataacat gttcaccagc atattcacc tctgcacat gagtggtgat cgatacattg 720  
 cagtctgcca ccctgtcaag gccttagatt tccgtactcc ccgaaatgcc aaaattatca 780  
 atgtctgcaa ctggatcctc tcttcagcca ttgggtcttc tgtaatgttc atggctacaa 840  
 caaaatacag gcaagggttc atagattgta cactaacatt ctctcatcca acctggtact 900  
 gggaaaacct cgtgaagatc tgtgttttca tcttcgcctt cattatgcca gtgctcatca 960  
 ttaccgtgtg ctatggactg atgatcttgc gcctcaagag tgtccgcatg ctctctggct 1020  
 ccaaagaaaa ggacaggaat cttcgaagga tcaccaggat ggtgctggtg gtggtggctg 1080  
 tgttcatcgt ctgctggact cccattcaca ttacgtcat cattaaagcc ttggttacaa 1140  
 tcccagaaac tacgttccag actgtttctt ggcacttctg cattgctcta ggttacacaa 1200  
 acagctgcct caaccagtc ctttatgcat ttctggatga aaacttcaaa cgatgcttca 1260  
 gagagtctg tatcccaacc tcttccaaca ttgagcaaca aaactccact cgaattcgtc 1320  
 agaacactag agaccacccc tccacggcca atacagtga tagaactaat catcagctag 1380  
 aaaatctgga agcagaaact gctccgttgc cctaacaggg tctcatgcca ttccgacctt 1440  
 caccaagctt agaagccacc atgtatgtgg aagcaggttg cttcaagaat gtgtaggagg 1500  
 ctctaattct ctaggaaagt gcctactttt aggtcatcca acctcttcc tctctggcca 1560  
 ctctgctctg cacattagag ggacagccaa aagtaagtgg agcatttgga aggaaaggaa 1620  
 tataccacac cgaggagtcc agtttgtgca agacaccag tggaaccaa acccatcgtg 1680  
 gtatgtgaat tgaagtcac ataaaagggtg acccttctgt ctgtaagatt ttattttcaa 1740  
 gcaaattatt atgacctcaa caaagaagaa ccatcttttg ttaagttcac cgtagtaaca 1800  
 cataaagtaa atgctacctc tgatcaaagc acctgaatg gaagggtccga gtctttttag 1860  
 tgtttttgca agggaatgaa tccattattc tattttagac ttttaacttc aacttaaaat 1920  
 tagcatctgg ctaaggcatc attttcacct ccatttcttg gttttgtatt gtttaaaaaa 1980  
 aataacatct ctttcatcta gctccataat tgcaaggga gagattagca tgaaaggtaa 2040  
 tctgaaacac agtcatgtgt canctgtaga aaggttgatt ctcatgcact ncaaatactt 2100  
 ccaaagagtc atcatggggg atttttcatt cttaggcttt cagtgggttg ttcttggaat 2160  
 tc 2162

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer N917F

<400> 2

ccttggttac aatcccagaa actac

24

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer N-998R

<400> 3

aggcagctgt ttgtgtaacc taga

24

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> misc#binding

<223> Probe N-945T, labeled 5'-terminal with FAM and 3'-terminal with TA

MRA

<400> 4

ccagactggt tcttggcact tctgcattg

29

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 核酸の定量方法及び核酸定量キット

【解決手段】 試料中の特定の標的核酸を定量するために用いられる検量線を作成するために用いられる標準品であって、化学合成によって得られる合成ポリヌクレオチドからなる標準品、これを用いる定量方法および定量キット、特定疾患の診断方法などを提供する。

【効果】 本発明の標準品は、化学合成によって得られる合成ポリヌクレオチドであり、従来の生合成によって得られるポリヌクレオチドからなる標準品と比較して、簡便な方法で目的とする配列のものを正確に得ることができるという利点がある。また、本発明の標準品は、生物学的コンタミネーションがないので、環境に対して安全であり、また高精度の定量を阻害する要因を少なくできるという利点がある。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000002934]

- |          |                     |
|----------|---------------------|
| 1. 変更年月日 | 1992年 1月22日         |
| [変更理由]   | 住所変更                |
| 住 所      | 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 |
| 氏 名      | 武田薬品工業株式会社          |